

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE  
(Case No. 03-769)

In the application of:

Enno Adema

Serial No.: 10/652,372

Filing Date: 08/29/2003

For: Improvement of Specificity in the  
Determination of Antithrombin

)  
)  
) Before the Examiner: Not yet assigned  
)  
)  
) Art Unit: 1641  
)  
)  
)

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

**TRANSMITTAL LETTER**

In regard to the above identified application:

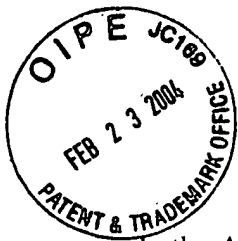
1. We are transmitting herewith the attached:
2.
  - a. Transmittal of Certified Copy;
  - b. Certified Copy of foreign application;
  - c. Postcard.
3. No Fee is required.
4. Please charge any additional fees or credit overpayment to Deposit Account No.13-2490.

Respectfully submitted,

McDONNELL BOEHNEN  
HULBERT & BERGHOFF

Patrick G. Gattari  
Reg. No. 39,682

CERTIFICATE OF MAILING UNDER 37 CFR § 1.8: The undersigned hereby certifies that this Transmittal Letter and the papers, as described in paragraph 1 hereinabove, are being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 on this 11 day of February 2004.



**PATENT**

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**  
**(Case No. 03-769)**

In the Application of:

Enno Adema

Serial No.: 10/652,372

Filing Date: 08/29/2003

For: Improvement of Specificity in the  
Determination of Antithrombin

)  
)  
) Before the Examiner: Not yet assigned  
)  
)  
) Art Unit: 1641  
)  
)  
)

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

**TRANSMITTAL OF CERTIFIED COPY**

Attached please find the certified copy of the foreign application from which priority is  
claimed for this case:

Country: Germany

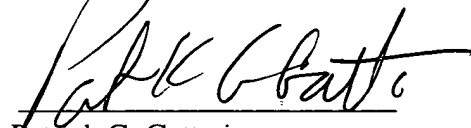
Application Number: 102 39 821.6

Filing Date: August 29, 2002

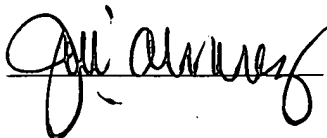
Respectfully submitted,

**McDONNELL BOEHNEN  
HULBERT & BERGHOFF**

By:

  
Patrick G. Gattari  
Reg. No.: 39,682

-----  
CERTIFICATE OF MAILING UNDER 37 CFR § 1.8: The undersigned hereby certifies that this Transmittal Letter and the  
papers, as described in paragraph 1 hereinabove, are being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage  
as first class mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 on this  
11 day of February 2004.



# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 102 39 821.6

**Anmeldetag:** 29. August 2002

**Anmelder/Inhaber:** Roche Diagnostics GmbH, Mannheim/DE

**Bezeichnung:** Verbesserung der Spezifität bei der Bestimmung  
von Antithrombin

**IPC:** C 12 Q 1/56

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 18. August 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Hintermeier'.

Hintermeier

# WEICKMANN & WEICKMANN

Patentanwälte

European Patent Attorneys · European Trademark Attorneys

Unser Zeichen:  
27996P DE/WWpu

Anmelder:  
Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Str. 112 - 132

68305 Mannheim

DIPL.-ING. **H. WEICKMANN** (bis 31.1.01)  
DIPL.-ING. **F. A. WEICKMANN**  
DIPL.-CHEM. **B. HUBER**  
DR.-ING. **H. LISKÁ**  
DIPL.-PHYS. DR. **J. PRECHTEL**  
DIPL.-CHEM. DR. **B. BÖHM**  
DIPL.-CHEM. DR. **W. WEISS**  
DIPL.-PHYS. DR. **J. TIESMEYER**  
DIPL.-PHYS. DR. **M. HERZOG**  
DIPL.-PHYS. **B. RUTTENSBERGER**  
DIPL.-PHYS. DR.-ING. **V. JORDAN**  
DIPL.-CHEM. DR. **M. DEY**  
DIPL.-FORSTW. DR. **J. LACHNIT**

---

Verbesserung der Spezifität bei der Bestimmung von Antithrombin

---

## **Verbesserung der Spezifität bei der Bestimmung von Antithrombin**

### **Beschreibung**

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Antithrombin III (AT) in Körperflüssigkeiten durch Zugabe eines AT-Bindepartners zur Probe und Bestimmung des freien AT-Bindepartners sowie ein dafür geeignetes Reagenz.

10

AT ist ein Faktor des Blutgerinnungssystems, der der Regulation dient. Die Blutgerinnung wird in Gang gesetzt durch das kaskadenartige Zusammenwirken verschiedener Proteasen. Der letzte der hintereinander geschalteten Aktivierungsschritte setzt Thrombin frei, das wiederum durch Spaltung von Fibrinogen Fibrinmonomere erzeugt, die sich zusammenlagern und einen Thrombus bilden. Wichtigster Regulator ist AT, das mit Thrombin und auch mit anderen an der Blutgerinnung beteiligten Proteasen einen Komplex bilden kann, der das aktive Zentrum blockiert. Der AT-Gehalt im Blut liegt bei gesunden Menschen in einem relativ engen Bereich.

15

Verminderte AT-Gehalte können durch eine Verbrauchskoagulopathie, eine schwere Lebererkrankung oder erblich bedingt sein. Ein verminderter AT-Gehalt wird heute allgemein als Thromboserisiko gewertet. Deshalb ist in manchen Fällen der AT-Gehalt auch bei einer akuten Thrombose reduziert. Der AT-Gehalt ist daher ein wertvoller Parameter in der klinischen Diagnostik.

20

Es sind bereits verschiedene Verfahren zum Nachweis von AT bekannt, bei denen einer Probe ein AT-Bindepartner unter Bedingungen zugesetzt wird, bei denen eine Interaktion des AT-Bindepartners mit in der Probe vorhandenem AT erfolgen kann, und anschließend eine Bestimmung des Anteils von freiem AT-Partner erfolgt. Derartige Bestimmungen können z.B. auf Basis immunologischer Methoden oder unter Verwendung chromogener

25

30

Substrate erfolgen. Im letzteren Fall wird der Probe z.B. Thrombin oder aktivierter Faktor X zugesetzt, das mit in der Probe vorhandenem AT interagiert. Überschüssiges Thrombin wird dann durch Inkubation mit einem chromogenen Substrat, das durch Einwirkung von Thrombin eine gefärbte Substanz bildet, und Auswertung der Farbbildung nachgewiesen, wobei der AT-Gehalt in indirektem Verhältnis zu der Farbbildung steht. Verfahren zur Bestimmung von AT sind beispielsweise beschrieben in Bergmeyer, "Methods of Enzymatic Analysis", 3d edition, Verlag Chemie, Vol. 5, S. 441-448; I. Witt, ed., "Neue Methoden der Gerinnungsanalyse mit chromogenen Substraten", Stormorken, Neue Methoden der Gerinnungsanalyse, Seite 119-121; Odegard et al., Haemostasis 7: 202-209 (1978); Fareed et al., Chromogenic Peptide Substrates (eds. M.F. Scully and V.V. Kakkar) Churchill Livingstone (1979) 183-191 und Abildgaard et al., Thromb. Res. 11, 549-553 (1977).

Ein Nachteil bekannter Verfahren zum Nachweis von AT durch Zugabe von Thrombin besteht darin, dass in Gegenwart von Störfaktoren, z.B. Arzneimitteln, wie etwa Hirudin, die selbst mit Thrombin interagieren können, ein falscher hoher AT-Wert erhalten wird. Dieser Nachteil kann durch Verwendung von aktiviertem Faktor Xa anstelle von Thrombin vermieden werden. Es befinden sich derzeit jedoch mehrere Faktor Xa-Inhibitoren in der Entwicklung als Therapeutikum (Ostrem et al., Biochemistry 37 (1998), 1053-1059; US-Patent 5,783,421; US-Patent 5,721,214; WO 96/40679; US-Patent 5,693,641; WO 97/46523; JP-96-191434 etc.). Wenn diese Mittel auf den Markt kommen, treten bei einem auf Faktor Xa basierenden Nachweisverfahren die gleichen Probleme wie bei dem auf Thrombin basierenden Test auf.

Es war daher Aufgabe der Erfindung, bekannte Nachweismethoden zu verbessern und ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, das auch bei Anwesenheit von Störfaktoren in der zu testenden Probe zu einem zuverlässigen Messergebnis führt.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zum Nachweis von Antithrombin III (AT) in einer Probe, die eventuell einen Störfaktor enthält, umfassend die Schritte:

- 5 (a) Inkontaktbringen der Probe mit einem ersten Reagenz R1 enthaltend einen AT-Bindepartner unter Bedingungen, bei denen der AT-Bindepartner im Wesentlichen nicht mit AT interagiert, aber mit dem Störfaktor interagiert,
- (b) Zugabe eines zweiten Reagenz R2 zu einer ersten Bestimmung des freien Anteils des AT-Bindepartners,
- 10 (c) Zugabe eines dritten Reagenz R3 zur Änderung der Bedingungen, so dass der AT-Bindepartner mit AT interagiert, und zweite Bestimmung des freien Anteils des AT-Bindepartners und
- (d) Ermitteln des AT-Gehalts in der Probe aus der Differenz der ersten und zweiten Bestimmung des freien Anteils des AT-Bindepartners.

15

Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst den Nachweis von AT in einer Probe, insbesondere in einer Körperflüssigkeit, wie etwa Blut oder Plasma, basierend auf der Bestimmung der Interaktion eines AT-Bindepartners mit in der Probe vorhandenem AT, wobei man eine erste Bestimmung des AT-Bindepartners ohne AT-Interaktion und danach eine zweite Bestimmung des AT-Bindepartners mit AT-Interaktion durchführt und den AT-Gehalt der Probe aus der Differenz der ersten und der zweiten Bestimmung ermittelt.

Das erfindungsgemäße Verfahren basiert darauf, dass zwei Bestimmungen des freien Anteils von AT-Bindepartner in der Probe bei unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt werden. Eine erste Bestimmung des AT-Bindepartners erfolgt ohne AT-Interaktion, d.h. unter Bedingungen, bei denen vorhandenes AT im Wesentlichen nicht, d.h. nicht oder nur in einem die Bestimmung nicht wesentlich beeinträchtigendem Ausmaß, mit dem AT-Bindepartner interagiert, weil AT beispielsweise nicht in aktiver Form vorliegt. Anschließend erfolgt eine Änderung der Bedingungen, so dass in der Probe vorhandenes AT mit dem AT-Bindepartner interagieren kann,

indem, beispielsweise durch Zugabe eines geeigneten Reagenz, Bedingungen eingestellt werden, unter denen die Interaktion, z.B. Komplexbildung zwischen AT und AT-Bindepartner, beschleunigt wird. Die nachfolgende zweite Bestimmung des restlichen freien (und aktiven) AT-Bindepartners erlaubt einen Rückschluss auf den AT-Gehalt der Probe.

Die Bestimmung des freien AT-Bindepartners kann grundsätzlich nach jeder beliebigen Methode durchgeführt werden. Bevorzugt sind chromogene Aktivitätsbestimmungen, bei denen beispielsweise eine proteolytische Aktivität von AT-Bindepartnern, wie Thrombin oder Faktor Xa, erfolgt, oder eine immunologische Bestimmung, bei der beispielsweise Antikörper eingesetzt werden, die spezifisch gegen einen nicht (mit AT) komplexierten AT-Bindepartner gerichtet sind, und die anschließende Komplexbildung zwischen AT und AT-Bindepartnern nicht stören.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst eine Bestimmung der proteolytischen Aktivität eines AT-Bindepartners. Dabei wird die nach Reaktion mit einem Störfaktor verbleibende proteolytische Aktivität des AT-Bindepartners unter Bedingungen bestimmt, bei denen in der Probe vorhandenes AT nicht oder nur geringfügig mit dem AT-Bindepartner reagieren kann. Anschließend erfolgt eine Beschleunigung der Komplexbildung zwischen AT und AT-Bindepartner, z.B. durch Aktivierung des AT. Dabei bilden sich aus dem aktivierten AT und dem Bindepartner Komplexe. Ein derartig komplexierter Bindepartner hat im Wesentlichen keine proteolytische Aktivität mehr. Anschließend wird erneut die Aktivität des Bindepartners bestimmt. Die Differenz zwischen der ersten und der zweiten Aktivität entspricht der Menge an AT in der Probe.

Der AT-Bindepartner ist eine nachweisbare Substanz, vorzugsweise eine Substanz mit Protease-Aktivität, die einen Komplex mit AT bilden kann und dadurch vorzugsweise inhibiert wird. Beispiele für geeignete AT-



Bindepertner sind Thrombin und Faktor Xa. Besonders bevorzugt verwendet man Thrombin.

Der Nachweis des AT-Bindepertners erfolgt vorzugsweise durch ein  
5 chromogenes Substrat, das unter Einwirkung des AT-Bindepertners eine  
Farbe bildet und Messung der entstehenden Farbe. Beispiele für bevorzugte  
Substrate sind peptidische Substrate, beispielsweise das Thrombinsubstrat  
Tos-Gly-Pro-Arg-p-Nitroanilin (Chromozym<sup>®</sup>TH), das unter Einwirkung von  
Thrombin zu Tos-Gly-Pro-Arg-OH und p-Nitroanilin umgesetzt wird.  
10 Selbstverständlich sind jedoch auch andere Substrate, die von dem  
entsprechenden AT-Bindepertner akzeptiert werden, geeignet.

Im Gegensatz zu Verfahren des Standes der Technik erfolgt im  
erfindungsgemäßen Verfahren eine erste Bestimmung der Aktivität des AT-  
15 Bindepertners unter Bedingungen, bei denen in der Probe vorhandenes AT  
nicht oder nur geringfügig den Bindepertner komplexieren und dessen  
Aktivität hemmen kann. Die erste Bestimmung wird daher  
zweckmäßigerweise in Abwesenheit von Substanzen, wie etwa Heparin,  
durchgeführt, die eine Komplexbildung zwischen AT und AT-Bindepertner  
20 beschleunigen. Gegebenenfalls können Antagonisten für den Beschleuniger,  
beispielsweise Heparin-Antagonisten, wie etwa Polybren, in geringen  
Mengen zugesetzt werden. Die Zugabe von Heparin-Antagonisten ist  
insbesondere dann sinnvoll, wenn ein Patient zuvor mit Heparin behandelt  
worden ist, so dass eine vorhandene (geringe) Heparinkonzentration in der  
25 Probe zu einer ungewollten Beschleunigung der Komplexbildung zwischen  
AT und AT-Bindepertner führt. Die Zugabe von Antagonisten kann diese  
ungewollte Beschleunigung zumindest teilweise verhindern.

Nach der ersten Bestimmung des freien AT-Bindepertners wird der  
30 Reaktionsmischung vorzugsweise ein weiteres Reagenz zugesetzt, das  
einen Beschleuniger der Komplexbildung enthält, beispielsweise Heparin.  
Anschließend erfolgt die Bestimmung einer zweiten Aktivität unter

Bedingungen, bei denen in der Probe vorhandenes AT den AT-Bindepartner komplexieren kann. Der AT-Gehalt in der Probe kann aus der Differenz der ersten und der zweiten Bestimmung ermittelt werden. Das gemessene Signal ist umgekehrt proportional zur AT-Konzentration in der Probe. Falls  
5 erforderlich, kann das dritte Reagenz weiterhin zusätzlichen AT-Bindepartner enthalten. Außerdem kann in einem weiteren Schritt zusätzliches Substrat pipettiert werden, sofern in der ersten Bestimmung bereits zuviel Substrat verbraucht worden ist.

10 Die Bestimmung des AT-Bindepartners erfolgt nach grundsätzlich bekannten Methoden, beispielsweise wie im Antithrombin III-Test von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, beschrieben. Die Bestimmung kann z.B. einen kinetischen Test oder eine Zweipunktbestimmung umfassen.

15 Weiterhin betrifft die Erfindung einen Reagenzienkit zum quantitativen Nachweis von AT in einer Probe, umfassend:

- (a) ein erstes Reagenz R1 enthaltend einen AT-Bindepartner,
- (b) ein zweites Reagenz R2 zu einer Bestimmung des freien AT-Bindepartners und  
20
- (c) ein drittes Reagenz R3 enthaltend einen Beschleuniger für die Interaktion zwischen AT und AT-Bindepartner, wobei das dritte Reagenz R3 separat vom ersten Reagenz R1 ist.

25 Das erste Reagenz R1 ist frei von einem Beschleuniger für die Interaktion, beispielsweise Komplexbildung, zwischen AT und AT-Bindepartner. Gegebenenfalls kann das erste Reagenz auch einen Antagonisten für einen derartigen Beschleuniger enthalten. Das zweite Reagenz R2 zur Bestimmung des AT-Bindepartners kann ein für die chromogene Bestimmung  
30 geeignetes Reagenz sein, das beispielsweise ein Substrat für den AT-Bindepartner enthält. Weiterhin kann das zweite Reagenz jedoch auch für die immunologische Bestimmung geeignet sein und beispielsweise

Antikörper gegen einen freien ungebundenen AT-Bindepartner und gegebenenfalls weitere Reagenzien zur Durchführung eines immunologischen Tests, z.B. eines Latex-Tests, enthalten. Das dritte Reagenz R3 ist getrennt vom ersten Reagenz R1 und enthält einen Beschleuniger für die Interaktion, beispielsweise Komplexbildung zwischen AT und AT-Bindepartner, vorzugsweise Heparin.

10

Die Bestimmung kann an gängigen Analyseautomaten, wie etwa Hitachi, z.B. Hitachi-Modell 911, und Integra durchgeführt werden.

Weiterhin soll das erfindungsgemäße Verfahren durch das nachfolgende Beispiel erläutert werden:

### **Bestimmung von Antithrombin III in Gegenwart von Lepirudin**

15

#### **1. Reaktionsschema**

20

3  $\mu$ l Probenlösung wurden in eine Messküvette pipetiert. Dazu wurden 175  $\mu$ l Reagenz R1 pipetiert. Das Reagenz R1 besteht aus 100 mM Tris-HCl, 270 mM NaCl, 12 mM EDTA, 10 g/l Polyethylenglycol 6000, 1 g/l Rinderserumalbumin, 0,5 NIH/ml Rinderthrombin und einer geeigneten Menge eines Fibrinpolymerisations-Inhibitors, wie GPAP, pH 8,10. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 5 min und danach die Zugabe von 75  $\mu$ l Reagenz R2 (Chromozym TH 1,9 mM). Dann wurde durch kontinuierliche bichromatische Messung bei 415 und 700 nm (Primär- bzw. Sekundärwellenlänge) in einem kinetischen Test die erste Thrombinaktivität bestimmt.

25

30

Schließlich wurden 175  $\mu$ l Reagenz R3 (100 mM Tris-HCl, pH 8,1; Heparin 2 USP-E/ml; Rinderthrombin (3,5 NIH/ml; 140 mM NaCl) zugegeben und durch kontinuierliche Messung in einem kinetischen Test die zweite Thrombinaktivität bestimmt. Der AT-Gehalt wurde aus der Differenz der

zweiten und ersten Thrombinaktivität entsprechend der Vorschrift des Antithrombin III-Kits von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, ermittelt.

5 Diese Bestimmung wurde in Gegenwart unterschiedlicher Mengen an Hirudin (Lepirudin®, Fa. Behringwerke) (0, 1, 2, 4 und 8 µg/ml) durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle gezeigt.

10

Lepirudin® (µg/ml)	AT- konzentration (%) gefunden (Erfindung)	Abweichung (%) mit Test gemäß Erfindung	Abweichung (%) mit Test gemäß Stand der Technik
0	100	--	--
1	100	0	5
2	99,9	0	10
15 4	102,5	3	25
8	130,0	30	52

15 Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass die Störung durch Lepirudin® bis zu einer Konzentration von 4 µg/ml vollständig (Abweichung < 5 %) beseitigt werden kann. Die therapeutischen Konzentrationen bei Verabreichung von  
20 Lepirudin® liegen üblicherweise innerhalb dieses Bereichs, so dass durch das erfindungsgemäße Verfahren eine zuverlässige Bestimmung des AT-Gehalts auch in Gegenwart von potentiell störenden Arzneimitteln erreicht wird.

### **Ansprüche**

1. Verfahren zum Nachweis von Antithrombin III (AT) in einer Probe,  
5 die eventuell einen Störfaktor enthält, umfassend die Schritte:
  - (a) Inkontaktbringen der Probe mit einem ersten Reagenz R1  
enthaltend einen AT-Bindepartner unter Bedingungen, bei  
denen der AT-Bindepartner im Wesentlichen nicht mit AT  
interagiert, aber mit dem Störfaktor interagiert,
  - 10 (b) Zugabe eines zweiten Reagenz R2 zu einer ersten  
Bestimmung des freien Anteils des AT-Bindepartners,
  - (c) Zugabe eines dritten Reagenz R3 zur Änderung der  
Bedingungen, so dass der AT-Bindepartner mit AT interagiert,  
und zweite Bestimmung des freien Anteils des AT-  
15 Bindepartners und
  - (d) Ermitteln des AT-Gehalts in der Probe aus der Differenz der  
ersten und zweiten Bestimmung des freien Anteils des AT-  
Bindepartners.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass das erste Reagenz R1 einen AT-Bindepartner ausgewählt aus  
Thrombin und Faktor Xa enthält.
- 25 3. Verfahren nach Anspruch 2,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass das erste Reagenz R1 als AT-Bindepartner Thrombin enthält.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,  
30 **dadurch gekennzeichnet,**  
dass das zweite Reagenz R2 ein chromogenes Substrat zur  
Bestimmung von freiem AT-Bindepartner enthält.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass das zweite Reagenz R2 einen Antikörper zur Bestimmung von  
freiem AT-Bindepartner enthält.

5

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass das dritte Reagenz R3 einen Beschleuniger der Interaktion  
zwischen AT und AT-Bindepartner enthält.

10

7. Verfahren nach Anspruch 6,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass das dritte Reagenz R3 Heparin als Beschleuniger enthält.

15

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass das erste Reagenz R1 weiterhin einen Antagonisten für einen  
Beschleuniger der Interaktion zwischen AT und AT-Bindepartner  
enthält.

20

9. Verfahren nach Anspruch 8,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass das erste Reagenz R1 Polybren als Antagonisten von Heparin  
enthält.

25

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass das dritte Reagenz R3 weiterhin zusätzlichen AT-Bindepartner  
enthält.

30

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass die Bestimmung des AT-Bindepartners eine kinetische Bestimmung umfasst.

5

12. Verfahren zum Nachweis von Antithrombin III (AT) in einer Probe, basierend auf der Bestimmung der Interaktion eines AT-Bindepartners mit in der Probe vorhandenem AT,  
**dadurch gekennzeichnet,**

10

dass man eine erste Bestimmung des AT-Bindepartners ohne Interaktion mit AT und danach eine zweite Bestimmung des AT-Bindepartners mit AT-Interaktion durchführt und den AT-Gehalt in der Probe aus der Differenz der ersten und zweiten Bestimmung ermittelt.

15

13. Reagenzienkit zum quantitativen Nachweis von Antithrombin III (AT) in einer Probe, umfassend:

- (a) ein erstes Reagenz R1 enthaltend einen AT-Bindepartner,
- (b) ein zweites Reagenz R2 zu einer Bestimmung des freien AT-Bindepartners und
- (c) ein drittes Reagenz R3 enthaltend einen Beschleuniger für die Interaktion zwischen AT und AT-Bindepartner, wobei das dritte Reagenz R3 separat vom ersten Reagenz R1 ist.

20

25

14. Reagenzienkit nach Anspruch 13,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass das zweite Reagenz R2 für eine chromogene Bestimmung des AT-Bindepartners geeignet ist.

30

15. Reagenzienkit nach Anspruch 13,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass das zweite Reagenz R2 für eine immunologische Bestimmung  
des AT-Bindepartners geeignet ist.

5

16. Verwendung eines Reagenzienkits nach einem der Ansprüche 13 bis  
15 in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12.



### **Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Antithrombin III  
5 (AT) in Körperflüssigkeiten durch Zugabe eines AT-Bindepartners zur Probe  
und Bestimmung des freien AT-Bindepartners sowie ein dafür geeignetes  
Reagenz.

10

pu/ANM/27996P DE-29.08.2002